

学校编码: 10384

分类号 R651.2; R641; R453.9 密级 公开

学号: 24520111153400

UDC 616-003

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

恩再适对 CCI 大鼠痛觉过敏及脊髓 NR2B、  
NF- $\kappa$ B 和 iNOS 表达的影响

Effects of analgescine on hyperalgesia and expression of NR2B,  
NF- $\kappa$ B and iNOS in spinal cord in CCI rats

叶永贤

指导教师姓名: 丁真奇 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩日期: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 5 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        ) 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        ) 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

## 摘 要

**目的:** 1. 观察坐骨神经慢性损伤大鼠机械痛阈及热痛阈的变化, 测定坐骨神经慢性压迫性损伤(Chronic constriction injury, CCI)大鼠脊髓 N-甲基 D-天冬氨酸受体 2B 亚基(N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B, NR2B)、核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)和诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达, 探讨神经病理性疼痛的发病机制。

2. 观察恩再适对 CCI 大鼠痛觉过敏及脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 表达的影响。

**方法:** 1. 56 只 180-220 g 雄性 SD 大鼠随机分为 2 组: 分别为 Sham 组 (假手术组,  $n=8$ ) 和 CCI 组 (CCI 组,  $n=48$ )。于术前 1 d、术后 1 d、4 d、7 d、14 d、21 d 测定机械痛阈 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热痛阈 (paw withdrawal latency, PWL) 后处死, 取 L4-6 脊髓, 采用逆转录-聚合酶链式反应 (Reverse transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达。

2. 96 只 180-220g 雄性 SD 大鼠随机分为 2 组: 分别 CCI 组(CCI 模型组,  $n=48$ )和 A 组 (恩再适封闭治疗组,  $n=48$ )。测定 MWT 和 PWL 后处死大鼠, 取 L4-6 脊髓, 采用实时定量 PCR(Real time quantitative PCR, qPCR)和 WB 方法检测脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达。

**结果:** 1. 与 Sham 组相比, CCI 组术侧从术后 1 d 开始出现 MWT 值下降 ( $P<0.01$ ,  $n=8$ ), 术后 7 d 降至最低 ( $P<0.01$ ,  $n=8$ )。术后 14 d 时仍处于较低水平 ( $P<0.01$ ,  $n=8$ )。与 Sham 组相比, CCI 组术侧从术后 1 d 开始出现 PWL 值下降 ( $P<0.01$ ,  $n=8$ ), 术后 7 d 降至最低 ( $P<0.01$ ,  $n=8$ )。术后 14 d 时仍处于较低水平 ( $P<0.01$ ,  $n=8$ )。脊髓组织中 NR2B 和 NF- $\kappa$ B 于损伤后 1 d 开始增加 ( $P<0.01$ ,  $n=4$ ); 7 d 达到高峰, 与术前相比有显著性意义 ( $P<0.01$ ,  $n=4$ )。术后 14 d 虽有所降低, 但仍维持在较高水平 ( $P<0.01$ ,  $n=4$ )。iNOS mRNA 的表达于术后 1d 开始增加 ( $P<0.01$ ,  $n=4$ ), 术后 14 d 达到高峰, 显著高于术前 ( $P<0.01$ ,  $n=4$ ), 术后 21 d 时仍保持较高水平表达 ( $P<0.01$ ,  $n=4$ )。iNOS mRNA 与 NR2B mRNA 和 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达呈显著正相关 ( $r=0.833$ ,  $P<0.05$ ;  $r=0.842$ ,  $P<0.05$ )。

2. 术后 CCI 组 MWT 及 PWL 较术前明显降低( $n=8$ ,  $P<0.01$ ), A 组 MWT 及 PWL 明显高于 CCI 组( $n=8$ ,  $P<0.05$ )。CCI 组术后脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达较术前明显升高( $n=4$ ,  $P<0.05$ ), A 组脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达较 CCI 组明显降低( $n=4$ ,  $P<0.05$ )。

**结论:** 1. CCI 术后大鼠脊髓中 NR2B、NF- $\kappa$ B 及下游 iNOS 表达增加, 可能与神经病理性疼痛的产生和维持有关。

2. 恩再适封闭治疗能够改善 CCI 大鼠痛觉过敏, 其作用效应与影响脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达有关。

**关键词:** 神经病理性疼痛; N-甲基 D-天冬氨酸受体 2B 亚基; 核因子- $\kappa$ B; 诱导型一氧化氮合酶; 恩再适; 痛觉过敏

## Abstract

**AIM:** 1.To observe expression of NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS in the spinal cord in rat model of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve.

2.To observe the effects of analgescine on hyperalgesia and expression of NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS in the spinal cord in rat model of the chronic constriction injury of the sciatic nerve.

**MERHODS:** 1.Fifty-six adult male Sprague-Dawley rats weighing 180-220 g were randomly divided into sham group (sham operation, n=8) and CCI group (CCI modeling, n=48). The mechanical withdrawal threshold (MWT) and paw withdrawal latency (PWL) of the hind paws were measured before CCI 1 day and on the 1st, 4th, 7th, 14th and 21st day after surgery. The L4-6 segment of the spinal cord was taken for determining the expression of NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS by RT-PCR and Western blotting.

2. Ninty-six adult male Sprague-Dawley rats weighing 180-220g were randomly divided into two groups: CCI group (CCI model, n=48) and A group (The block therapy of analgescine, n=48). After the MWT and PWL were measured, the L4-6 segment of the spinal cord were taken for determination the expression of NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS using real time PCR and Western blot.

**RESULTS:** 1.On the 1st, 4th, 7th, 14th and 21st day after surgery, the MWT and PWL in CCI group were obviously lower than those in sham group. The result of RT-PCR and WB showed that NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS increased significantly. Positive correlation was found between the mRNA expression of NR2B and iNOS ( $r=0.833$ ,  $P<0.05$ ), and between the mRNA expression of NF- $\kappa$ B and iNOS ( $r=0.842$ ,  $P<0.05$ ).

2. Postoperative MWT and PWL of CCI group were obviously decreased than preoperative rats (n=8,  $P<0.01$ ). The MWT and PWL of A group were increased significantly when compared to CCI group (n=8,  $P<0.05$ ). NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS increased significantly when compared to preoperative rats (n=4,  $P<0.05$ ). When A group was compared to CCI group, NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS decreased significantly (n=4,  $P<0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** 1.The generation and maintainance of hyperalgesia in sciatic nerve injured rats may attribute to the activation of NR2B and NF- $\kappa$ B concomitant increase in iNOS.

2. The block therapy of analgescine can obviously improve the hyperalgesia of CCI rats. The change of expression of NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS in the spinal cord may result in this effect.

**Keywords:** Neuropathic pain; N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B; Nuclear factor-kappa B; Inducible nitric oxide synthase; Analgescine; Hyperalgesia

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
NPP	Neuropathic Pain	神经病理性疼痛
CCI	Chronic Constriction Injury	慢性压迫性损伤
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B	核因子- $\kappa$ B
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid Receptor 2B	N-甲基 D-天冬氨酸受体 2B 亚基
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	诱导型一氧化氮合酶
DRG	Dorsal Root Ganglion	背根神经节
PVDF	Polivinyldene Fluoride	聚偏二氟乙烯膜
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase chain reaction	逆转录-聚合酶链式反应
MWT	Mechanical Withdrawal Threshold	机械痛阈
PWL	Paw Withdrawal Latency	热痛阈
WB	Western Blot	蛋白质印迹法
NeuPSIG	Neuropathic Pain Special Interest Group of the International Association for the Study of Pain	国际疼痛研究学会的神 经病理性疼痛专家研究 小组
I $\kappa$ B	Inhibition kappa B	NF- $\kappa$ B 抑制性蛋白
qPCR	Real time quantitative PCR	实时定量 PCR
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$	白细胞介素-1 $\beta$
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase	神经元型一氧化氮合酶
VDSC	Voltage-Dependent Sodium Channels	电压门控钠离子通道
VDCC	Voltage-Dependent Calcium Channels	电压依赖性钙离子通道



# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
前言.....	1
<b>第一章 神经病理性大鼠脊髓 NR2B、NF-<math>\kappa</math>B 和 iNOS 的表达和意义 .....</b>	<b>3</b>
<b>1 材料与仪器.....</b>	<b>3</b>
1.1 实验动物与分组.....	3
1.2 主要实验仪器.....	3
1.3 主要实验试剂及耗材 .....	3
1.4 主要试剂的配制.....	4
<b>2 主要实验方法 .....</b>	<b>6</b>
2.1 动物模型的制备.....	6
2.2 机械痛阈测定.....	6
2.3 热痛阈测定 .....	7
2.4 逆转录-聚合酶链式反应 .....	7
2.5 蛋白质印迹法.....	8
2.6 统计学分析 .....	10
<b>3 结果与讨论.....</b>	<b>11</b>
3.1 主要实验结果.....	11
3.2 讨论.....	15

4 结论.....	22
<b>第二章 恩再适对大鼠痛觉过敏及脊髓 NR2B、NF-<math>\kappa</math>B 和 iNOS 表达的影响</b>	
.....	23
<b>1 材料与仪器.....</b>	<b>23</b>
1.1 实验动物与分组.....	23
1.2 主要试剂及仪器.....	23
<b>2 主要实验方法 .....</b>	<b>24</b>
2.1 动物模型的制备.....	24
2.2 给药方法.....	24
2.3 机械痛阈测定.....	24
2.4 热痛阈测定 .....	24
2.5 脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 表达的测定 .....	24
2.6 统计学分析 .....	25
<b>3 结果与讨论.....</b>	<b>27</b>
3.1 主要实验结果.....	27
3.2 讨论.....	31
<b>4 结论.....</b>	<b>34</b>
<b>第三章 全文结论.....</b>	<b>35</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>36</b>
<b>附录.....</b>	<b>41</b>

致谢.....	45
---------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

## Table of Content

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>III</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter 1 Expression of NR2B, NF-<math>\kappa</math>B and iNOS in spinal cord in CCI rats</b>	
<b>.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Materials and Instruments .....</b>	<b>3</b>
1.1 Experimental animals and Grouping .....	6
1.2 Main experimental instruments.....	6
1.3 Main reagent and supplies .....	6
1.4 Preparation of main reagent .....	6
<b>2 Methods .....</b>	<b>3</b>
2.1 Preparation of animal models .....	6
2.2 Determination of MWT .....	6
2.3 Determination of PWL.....	7
2.4 RT-PCR.....	7
2.5 WB .....	8
2.6 Statistical Analysis.....	10
<b>3 Results and Discussion .....</b>	<b>11</b>
3.1 Main results.....	11

3.2 Discussion .....	15
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>22</b>
<b>Chapter 2 Effects of analgesine on hyperalgesia and expression of NR2B, NF-<math>\kappa</math>B and iNOS in CCI rats .....</b>	<b>23</b>
<b>1 Materials and Instruments .....</b>	<b>23</b>
1.1 Experimental animals and Grouping .....	23
1.2 Main reagent and instruments .....	23
<b>2 Methods .....</b>	<b>24</b>
2.1 Preparation of animal models .....	24
2.2 Administration .....	24
2.3 Determination of MWT .....	24
2.4 Determination of PWL.....	24
2.5 Determination of expression of NR2B, NF- $\kappa$ B and iNOS .....	24
2.6 Statistical Analysis.....	25
<b>3 Results and Discussion .....</b>	<b>27</b>
3.1 Main results.....	27
3.2 Discussion .....	31
<b>4 Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>Chapter 3 Conclusion .....</b>	<b>35</b>
<b>References .....</b>	<b>36</b>
<b>Appendixes.....</b>	<b>41</b>

<b>Acknowledgement .....</b>	<b>41</b>
------------------------------	-----------

厦门大学博硕士论文摘要库

## 前 言

国际疼痛研究会将神经病理性疼痛(Neuropathic Pain, NPP)定义为: 由于中枢或外周神经系统的直接损伤和功能紊乱引起的疼痛, 它属于一种慢性疼痛, 主要表现为痛觉过敏、异常疼痛、感觉异常和自发性疼痛等<sup>[1]</sup>。原发病可包括自身免疫性疾病(如多发性硬化)、代谢性疾病(如糖尿病性神经病变)、感染(带状疱疹后神经痛)、血管病(如卒中)、神经受压、神经创伤和癌症等<sup>[2]</sup>。神经病理性疼痛的发病率高, 病因复杂, 严重影响患者的生活质量。对神经病理性疼痛发病机制和治疗的研究成为临床医生和基础科学研究者面临的迫切需要解决的问题。

随着新的神经病理性动物模型的不断涌现, 分子生物学技术的日趋进步, 对神经病理性疼痛分子机制的研究也日益深入。但距离神经病理性疼痛完整机制的阐明仍有很长的路要走。在神经病理性疼痛分子机制的研究中, 多项实验结果表明 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 在神经病理性疼痛中发挥重要作用, 在神经病理性疼痛的大鼠模型中的表达增加。这些研究多集中于单一细胞因子在神经病理性疼痛中表达及作用的考察。然而神经病理性疼痛是一个复杂的信号网络共同作用的过程。单一因子的分子机制不足以解释神经病理性疼痛的发生和发展, 并且在神经病理性疼痛的治疗中针对单一因子的治疗容易引起副作用的产生。明确在神经病理性疼痛中发挥重要作用的因子间的相互作用关系, 显得迫切且重要。

在神经病理性疼痛的治疗中, 最常用的治疗方法仍是药物治疗。但是由于神经病理性疼痛对大多数镇痛药物不敏感及药物副作用的存在, 药物治疗在神经病理性疼痛治疗中的效果并不好。寻求一种副作用小、疗效确切的药物针对神经病理性疼痛进行治疗并明确其作用机制, 是当前研究的重点和热点。

恩再适作为牛痘疫苗致炎家兔皮肤后所提取的生物制剂, 具有独特的改善感觉异常, 消除慢性疼痛, 调节免疫和植物神经功能, 促进神经细胞修复等作用<sup>[3]</sup>。单独或者联合其他药物(抗病毒药物、糖皮质激素等)被广泛应用于多种慢性疼痛及疼痛后遗症的治疗<sup>[4-5]</sup>。但是, 它在神经病理性疼痛中的具体作用机制还未见相关报道。

本研究拟通过: 1. 建立 CCI 模型, 观察 CCI 大鼠 MWT 及 PWL 的变化。通过 RT-PCR

和 WB 方法,测定 CCI 大鼠脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达。旨在探讨神经病理性疼痛的发病机制。2.对 CCI 大鼠使用恩再适封闭治疗,测定其机械痛阈值和热痛阈值,观察恩再适对 CCI 大鼠痛觉过敏的影响;并通过 qPCR、WB 及免疫组织化学染色方法,比较各组大鼠脊髓 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达,分析恩再适引起的 NR2B、NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达变化在 NPP 治疗中的作用。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库